



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: ESTRUTURA,
CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

Trabalho submetido por
Gonçalo Nascimento Augusto Santana Jorge
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

setembro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: ESTRUTURA,
CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

Trabalho submetido por
Gonçalo Nascimento Augusto Santana Jorge
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Alexandre Quintas

setembro de 2018

Dedicatória

Dedico assim esta dissertação
aos meus avós pelo grande papel na minha educação.
Espero que estejam orgulhosos!

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família pelo apoio durante os meus anos de faculdade, especialmente aos meus pais que, mesmo com algum atraso na conclusão desta etapa, sempre me proporcionaram as melhores condições para a realizar. Sem eles não teria sido possível.

De seguida gostaria de agradecer a uma outra família que neste último ano também passou a ser minha e que me deu uma motivação extra para a conclusão da minha tese de mestrado e com quem posso contar em qualquer dificuldade com que me depare. Arminda, Vítor e José, muito obrigado pelo apoio dado!

Um agradecimento ao Professor Doutor Alexandre Quintas pela sua orientação e ensinamentos durante este último passo na minha formação universitária.

Por último, mas das pessoas mais importantes na minha vida a quem devo o obrigado mais especial, o maior agradecimento à minha namorada, Sara dos Santos Pereira, por ter tornado isto possível e por ter sido o meu pilar neste último ano. Espero que estejas orgulhosa.

Resumo

Apesar de terem sido descobertos há quase um século, os péptidos antimicrobianos não tiveram uma grande relevância no panorama farmacêutico devido ao aparecimento dos antibióticos. Com o surgimento de uma variedade imensa de resistências a estes meios de combate aos agentes patogénicos, são necessárias novas terapêuticas alternativas às terapêuticas de primeira linha. Daí que o estudo destes péptidos tenha sido reforçado nos últimos anos.

Os péptidos antimicrobianos são péptidos geralmente curtos e anfipáticos que podem ser encontrados no sistema imunitário inato dos mais variados organismos. Estes possuem um espectro de atividade diversificado, visto serem ativos contra variados tipos de microrganismos (desde bactérias a parasitas). A sua propensão para a formação de estruturas secundárias regulares, quando em contacto com as membranas biológicas, permite que estes péptidos sejam classificados de acordo com esse nível de estrutura. No entanto, e mais importante, as propensões dos péptidos antimicrobianos para formar estruturas secundárias conferem diferenças quer nos seus mecanismos de ação, quer nos seus alvos. Assim, quando a ação é exercida sobre a membrana celular, geralmente ocorre por mecanismos de rutura e permeabilização. Quando a ação é sobre funções celulares, os péptidos atuam por interação com proteínas.

Embora alguns microrganismos possuam ou consigam adquirir resistências contra este tipo de péptidos, tais resistências são difíceis de obter devido à grande diversidade e especificidade destes.

No futuro, prevê-se que o estudo destes péptidos antimicrobianos continue a aumentar e que a quantidade de péptidos em ensaios clínicos também incremente. Os seus benefícios terapêuticos, em conjunto com a sua boa tolerabilidade e seletividade, antecipam uma alternativa terapêutica aos fármacos atuais, no combate aos microrganismos altamente resistentes.

Palavras-chave: Péptido antimicrobiano, microrganismo, fármaco, sistema imunitário

Abstract

Although they were discovered almost a century ago, antimicrobial peptides did not have a great relevance in the pharmaceutical scene due to the appearance of antibiotics. With the emergence of an immense variety of resistance to these pathogen-fighting agents, new therapeutic alternatives to first-line therapies are necessary. Hence the study of these peptides has been strengthened in recent years.

The antimicrobial peptides are generally short and amphipathic peptides that can be found in the innate immune system of the most varied organisms. These peptides have a diversified spectrum of activity, since they are active against several types of microorganisms (from bacteria to parasites). Their propensity for the formation of regular secondary structures, when in contact with biological membranes, allows these peptides to be classified according to this level of structure. However, and more importantly, the propensities of antimicrobial peptides to form secondary structures confer differences in both their mechanisms of action and their targets. Thus, when the action is exerted on the cell membrane, it usually occurs by mechanisms of rupture and permeabilization. When the action is on cellular functions, the peptides act by interaction with proteins.

Although some microorganisms possess or are able to acquire resistance against this type of peptides, such resistances are difficult to obtain because of their great diversity and specificity.

In the future, it is anticipated that the study of these antimicrobial peptides will continue to increase and that the amount of peptides in clinical trials will also increase. Their therapeutic benefits, together with their good tolerability and selectivity, anticipate a therapeutic alternative to current drugs in the fight against highly resistant microorganisms.

Key words: antimicrobial peptide, microorganism, drug, immune system

Índice Geral

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Capítulo I - Introdução

1. História.....	13
2. Sistema Imunitário.....	15
3. Péptidos Antimicrobianos.....	16
4. Necessidade de Novas Estratégias Antimicrobianas.....	21

Capítulo II - Estrutura, Classificação e Mecanismo de Ação

1. Estrutura dos Péptidos Antimicrobianos.....	25
2. Classificação dos Péptidos Antimicrobianos.....	31
3. Mecanismo de Ação dos Péptidos Antimicrobianos.....	35
4. Relação entre Estrutura, Classificação e Mecanismo de Ação.....	43

Capítulo III - Resistência aos PAMs.....

45

Capítulo IV - Conclusão.....

49

Capítulo V - Bibliografia.....

53

Índice de Figuras

Figura 1: Número total de novos antibióticos ao longo dos anos, até 2012.

Figura 2: Modelos moleculares das estruturas dos PAMs (Huang, Huang, & Chen, 2010).

Figura 3: Estrutura de uma hélice α (*Biochemistry* (2004)).

Figura 4: Esquema de pontes de hidrogénio de uma hélice α (*Biochemistry* (2004)).

Figura 5: Estrutura de uma folha β (*Biochemistry* (2004)).

Figura 6: Uma folha β antiparalela (*Biochemistry* (2004)).

Figura 7: Uma folha β paralela (*Biochemistry* (2004)).

Figura 8: O modelo “barrel-stave” (imagem da esquerda), o modelo “carpet-like” (imagem central) e o modelo do poro toroidal (imagem da direita) (Brogden, 2005).

Figura 9: Representação esquemática dos mecanismos de resistência aos PAMs. (A) Modificação dos ácidos teicóicos em bactérias Gram positivas. (B) Modificação do LPS em bactérias Gram negativas. (C) Secreção e introdução de moléculas carregadas positivamente na membrana. (D) Secreção para o meio extracelular de moléculas carregadas negativamente que se ligam aos PAMs. (E) Bombas de efluxo (Bahar & Ren, 2013).

Índice de Tabelas

Tabela 1: Modelos membranares e intracelulares de morte e lise celular pelos PAMs (adaptada de (Brogden, 2005)).

Tabela 2: PAMs em fase clínica de desenvolvimento (adaptada de (Mahlapuu, Håkansson, Ringstad, & Björn, 2016)).

Lista de abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

APD - Antimicrobial Peptide Database

ARN - Ácido Ribonucleico

CDC - Centro de Prevenção e Controlo de Doenças dos Estados Unidos da América

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

PAM - Péptido Antimicrobiano

OMS - Organização Mundial de Saúde

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

VSH – Vírus do *Herpes simplex*

História

“Há cerca de 100 anos atrás, os Péptidos Antimicrobianos (PAMs) foram identificados como uma parte importante da imunidade inata” (Martin, van Meegern, Doemming & Schuerholz, 2015).

No final dos anos 20, Alexander Fleming, identificou o que muitos autores consideram o primeiro exemplo de um péptido com atividade antimicrobiana: a lisozima (Benkerroum, 2008).

Desde logo existiu algum interesse neste péptido mas, em 1928, Fleming descobriu a penicilina e, em conjunto com Howard Florey e Ernst Chain, em 1940, viabilizaram a sua utilização terapêutica. Após esta descoberta, em conjunto com o aparecimento da estreptomicina, os antibióticos vieram a ter cada vez mais visibilidade e importância a nível terapêutico, o que fez com que o interesse nos antibióticos naturais do hospedeiro e na defesa imunitária destes se fosse perdendo (Zaffiri, Gardner & Toledo-Pereyra, 2012).

Com o aparecimento, nos anos 60, dos, cada vez mais frequentes, patogénios multirresistentes, o interesse nestas moléculas de defesa voltou a ser despertado (Davies, 2006).

Os péptidos antimicrobianos foram descobertos em 1939 por Dubos, quando este extraiu um agente antimicrobiano de uma estirpe de *Bacillus*, agente esse que protegeu ratinhos contra uma infeção pneumocócica. Em 1940, Hotchkiss e Dubos trabalharam nesse agente e identificaram um PAM a que chamaram gramicidina, eficaz para o tratamento de feridas e úlceras. Foi o primeiro péptido antimicrobiano alguma vez descrito (Bahar & Ren, 2013).

Ao longo dos anos uma variedade imensa de péptidos antimicrobianos tem vindo a ser descoberta: desde a tirocidina, em 1941, que, embora apresentasse efeitos tóxicos contra as células sanguíneas, era eficaz, tanto *in vitro* como *in vivo*, contra bactérias tanto Gram-positivas, como Gram-negativas (Dubos & Hotchkiss, 1941); à lactoferrina,

extraída do leite bovino (Groves, Peterson & Kiddy, 1965); passando pela defensina, em 1956, o primeiro PAM extraído de uma fonte animal (Hirsch, 1958).

Foi a partir de meados de 1960 que realmente começou o estudo e a investigação destes péptidos (Nakatsuji & Gallo, 2012). Em 1962, Kiss & Michl reportaram o que é considerado por alguns autores como o primeiro PAM de origem animal, a bombinina, isolada de um sapo (*Antimicrobial peptides* (2013)).

Atualmente são conhecidos cerca de 5000 PAMs. Os PAMs naturais são encontrados tanto em procariotas como eucariotas e acredita-se que sejam a primeira linha da defesa imunitária inata contra vírus, bactérias e fungos (Bahar & Ren, 2013).

Sistema Imunitário

Diferenciado em inato e adquirido, o sistema imunitário é a grande barreira de defesa do organismo humano. Este é constituído por diferentes componentes com funções protetoras do organismo: células que são capazes de reconhecer, capturar e eliminar microrganismos patogénicos (imunidade mediada por células) e componentes macromoleculares solúveis nos líquidos do organismo (sangue e linfa) que os tornam um ambiente pouco acolhedor para microrganismos (imunidade humoral).

A imunidade inata diz respeito aos mecanismos de defesa presentes desde o nascimento e que, para além de não necessitarem de exposição prévia, não se modificam após exposições repetidas a patógenos. Os agentes ativos da imunidade inata são expressos durante toda a vida, independentemente da sua ação efetora num determinado momento.

Pelo contrário, a imunidade adquirida necessita de uma exposição prévia ao patógeno e aumenta significativamente a sua atividade após exposições repetidas a esse mesmo patógeno. Este tipo de imunidade é quase nula no nascimento e vai aumentando de complexidade ao longo da vida consoante os patógenos a que um indivíduo é exposto (*Imunologia médica* (2004)).

Péptidos Antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos são oligopéptidos com um número variável de aminoácidos (podem variar de 5 a 100 aminoácidos, possuindo normalmente menos de 50) e são caracterizados pelas suas propriedades anfipáticas (*i. e.*, contêm uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica) e catiónicas. Estes péptidos fazem parte do sistema imunitário inato de uma variedade de seres vivos, representando um papel essencial na resposta imunitária de todo o tipo de organismos, incluindo os seres humanos. Apresentam um grande espectro de atividade, visto serem ativos contra bactérias, vírus, fungos e parasitas (Bahar & Ren, 2013; Martin et al., 2015; Seo, Won, Kim, Mishig-Ochir & Lee, 2012).

Podem ser encontrados nos mais diversos organismos, estando bastante presentes nos anfíbios, como os sapos, e nos aracnídeos, como as aranhas e os escorpiões. Segundo Wang & Wang, em Maio de 2015 existiam 42 PAMs isolados de aranhas e 63 de escorpiões na Antimicrobial Peptide Database (APD) (X. Wang & Wang, 2016).

Estes péptidos possuem algumas propriedades físico-químicas que aumentam ou diminuem a sua atividade antimicrobiana, para além da sua seletividade. Isto permite ultrapassar o grande obstáculo contra a sua aplicação clínica: a toxicidade contra as células eucariotas dos seres humanos, mamíferos, etc. As suas características catiónicas permitem que exista uma diferenciação entre as membranas procariotas (carga negativa muito alta, compostas, principalmente, por fosfatidilglicerol, cardiolipina ou fosfatidilserina) e as membranas eucariotas (carga neutra, ricas em fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina ou esfingomiélin, para além de um composto que pode reduzir a atividade de um PAM - o colesterol). Dentro dessas propriedades encontram-se (Brogden, 2005; Huang, Huang & Chen, 2010):

1. Dimensão

A dimensão de um péptido pode interferir em grande escala com a sua atividade. Uma alteração de tamanho pode aumentar a atividade antimicrobiana de um péptido em cerca de 5 a 7 vezes e diminuir a sua atividade hemolítica em cerca de 300 vezes, em relação ao péptido original (Huang et al., 2010).

Para além disso, segundo Westerhoff *et al.*, para possuir propriedades anfipáticas são necessários 7 a 8 aminoácidos, mas para atravessar a membrana já serão 8 ou 22, dependendo da sua estrutura em folha β ou em hélice α , respetivamente (Westerhoff, Juretić, Hendler & Zasloff, 1989).

2. Sequência

Normalmente este tipo de péptidos contém aminoácidos básicos, como a lisina e a arginina, e aminoácidos hidrofóbicos, como a alanina e a fenilalanina. Dependendo da sua sequência os péptidos podem possuir diferentes atividades, isto é, a sequência está diretamente relacionada com o seu mecanismo de ação (Brogden, 2005).

A sequência de um péptido é a primeira linha de estudo para a produção de péptidos antimicrobianos sintéticos. A sequência de aminoácidos vai afetar, para além das interações com as membranas, a capacidade antimicrobiana de um péptido, assim como a sua atividade hemolítica, que deve ser mínima (Giuliani, Pirri & Nicoletto, 2007).

3. Carga

A carga de um péptido define a sua atividade antimicrobiana e hemolítica. Jiang *et al.* observaram que num PAM anfipático em hélice α com 26 aminoácidos, denominado V13K, o aumento da sua carga base de +4 para +8 incrementou a sua atividade antimicrobiana, mantendo a sua atividade hemolítica reduzida (Jiang et al., 2008).

Giangaspero *et al.* demonstraram, em péptidos modelo, o efeito da carga na atividade de um péptido antimicrobiano. Ao diminuir a carga de um péptido para +3 (substituindo um aminoácido com carga positiva por outro sem carga) o resultado seria um péptido com uma potência bastante reduzida. Pelo contrário, aumentar a carga para +8 aumentava a atividade desse péptido contra leveduras mas diminuía a atividade contra bactérias (Giangaspero, Sandri, & Tossi, 2001).

4. Conformação e estrutura

A estrutura secundária de um péptido é um fator determinante para a sua função, o seu mecanismo de ação e a sua classificação. A propensão para um péptido adotar tal estrutura e conformação está diretamente ligada com a sua interação com as membranas dos microrganismos e consequente ação junto das mesmas (Seo et al., 2012).

A conformação de um péptido é dependente da interação com as membranas e determina o tipo de estrutura que esse péptido vai tomar aquando dessa interação. Assim, a conformação e a estrutura de um péptido são de grande importância para toda a sua função (Falanga et al., 2016).

5. Hidrofobicidade

A hidrofobicidade pode alterar totalmente a atividade e seletividade de um PAM. Geralmente, o incremento da hidrofobicidade do lado não polar de um péptido anfipático melhora a atividade antimicrobiana (Avrahami & Shai, 2002). Por seu lado, a hidrofobicidade diminuída reduz a atividade antimicrobiana (Dong et al., 2002).

Chen *et al.* determinaram que existe um intervalo de hidrofobicidade ótimo no qual se consegue atingir uma atividade antimicrobiana máxima, mantendo a atividade hemolítica em baixos níveis. Acima deste intervalo a atividade antimicrobiana era inibida e a atividade hemolítica era muito mais forte (Chen et al., 2007).

6. Anfipaticidade e momento hidrofóbico

“A capacidade de assumir uma estrutura anfipática é um requisito funcionalmente importante para um PAM se incorporar nas membranas. A anfipaticidade é usualmente quantificada pelo momento hidrofóbico, definido como a soma vetorial da hidrofobicidade dos aminoácidos individuais” (Huang et al., 2010).

Fernandez-Vidal *et al.* demonstraram que a anfipaticidade de um péptido é até mais importante para a ligação às membranas que a hidrofobicidade (Fernández-Vidal, Jayasinghe, Ladokhin, & White, 2007).

A capacidade de auto-associação é, por alguns autores, considerada importante para a atividade dos PAMs. A capacidade dos péptidos dimerizarem (formarem uma molécula com a associação de duas unidades) pode ser crítica, por exemplo, na passagem de um PAM para o interior da célula, isto é, se a capacidade de auto-agregação de um péptido for demasiado elevada, o péptido deixa de ter facilidade de desassociar e, conseqüentemente, passa a ter dificuldade de entrada na célula (Huang et al., 2010).

Para além destas propriedades físico-químicas e da atividade antimicrobiana direta, os PAMs possuem propriedades imunomodulatórias (estimulação da quimiotaxia, modulação da diferenciação das células imunitárias, supressão dos recetores do tipo toll, produção de citocinas pró-inflamatórias e atividade anti-endotoxinas) tornando-os compostos com elevado potencial para o desenvolvimento de novas terapêuticas (Mahlapuu et al., 2016). Estas novas terapêuticas têm como alvos diversos organismos e temos como exemplos o combate ao *Mycobacterium tuberculosis* (Padhi, Sengupta, Sengupta, Roehm, & Sonawane, 2014) e a atividade anti-biofilme contra *Bacillus pumilus*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Falanga et al., 2016).

Devido à crescente dificuldade em desenvolver novos fármacos para combater os agentes patogénicos multirresistentes na atualidade, os PAMs constituem uma base de trabalho de interesse clínico uma vez que as resistências aos antibióticos são uma

realidade cuja dimensão levou as Nações Unidas a considerá-las entre as listas de prioridades nos próximos anos. Para além disso, a pouca toxicidade a células de mamíferos juntamente com o facto das resistências a estes péptidos parecerem ser difíceis de adquirir devido à sua rápida ação, tornam os PAMs num potencial grande avanço a nível farmacêutico (Melo & Castanho, 2012).

Esta baixa propensão para a aquisição de resistência deve-se aos mecanismos de ação distintos dos PAMs: desintegração da membrana celular, inibição da síntese de proteínas, de ADN ou de ARN, interação com certos alvos intracelulares, entre outros.

Necessidade de Novas Estratégias Antimicrobianas

Antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários são os fármacos disponíveis para combater os tipos de microrganismos suscetíveis de causarem infecções em seres humanos.

Apesar de existir, hoje em dia, uma grande variedade de fármacos que combatam tanto bactérias como vírus, parasitas ou fungos, a emergência de resistências (para além das já existentes) tanto aos antibióticos como aos antivíricos, em adição à grande capacidade de mutação dos agentes virais face às terapêuticas existentes, tornam a descoberta de novas estratégias antimicrobianas um assunto de elevada importância para a saúde pública (Huang et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), “em 2016, globalmente mais de 490 mil pessoas ficaram infetadas com tuberculose multirresistente e a resistência aos fármacos está a começar a complicar a luta contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), bem como contra a malária.”

Como é do conhecimento geral, a indevida utilização dos antibióticos e as más práticas clínicas, aliadas à ocorrência natural de resistências (em grande parte por mutações genéticas (Strasfeld & Chou, 2011), acelera enormemente o processo de aquisição dessas resistências, tornando cada vez maior a dificuldade de descoberta de novos fármacos que combatam microrganismos resistentes.

Ainda segundo a OMS, e para realmente reforçar a necessidade de encontrar novas estratégias e fármacos antimicrobianos, hoje em dia existem bactérias resistentes aos antibióticos denominados de último recurso, tais como os carbapenemos e as cefalosporinas de 3^a geração, e foram até encontradas enterobactérias resistentes à colistina (de Maio Carrillho et al., 2017), um antibiótico apenas utilizado em tratamentos contra bactérias resistentes aos carbapenemos (tornando-as intratáveis); surgem algumas resistências à primeira linha de tratamento contra a malária; em alguns países cerca de 15% dos doentes estão infetados com VIH resistente a alguns fármacos; uma enorme percentagem de vírus *Influenza A* é resistente à amantidina e à rimantadina.

Apesar de existirem técnicas de prevenção (tais como a vacinação) contra alguns tipos de microrganismos, a pouca prevenção e controlo das infeções fazem com que se agravassem as resistências e com que sejam necessárias novas estratégias para combater microrganismos resistentes.

Mesmo sem resistências, os números são preocupantes: segundo o Relatório de Vigilância do Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças, em 2016, foram diagnosticados 160 453 novos casos de VIH na Europa. Segundo um relatório semelhante do Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, existiram 38 500 novos casos de VIH, em 2015.

Ainda no mesmo registo, segundo o CDC, 9 272 pessoas nos Estados Unidos da América contraíram tuberculose, em 2016, e cerca de 58 994 na Europa. Esta doença é uma das principais causas de morte em doentes infetados com VIH.

Para evidenciar esta necessidade de descoberta, segundo as mesmas fontes, o número de novos antibióticos descobertos ao longo dos anos tem vindo a decrescer. Na Figura abaixo apresenta-se um gráfico representante desse mesmo facto.

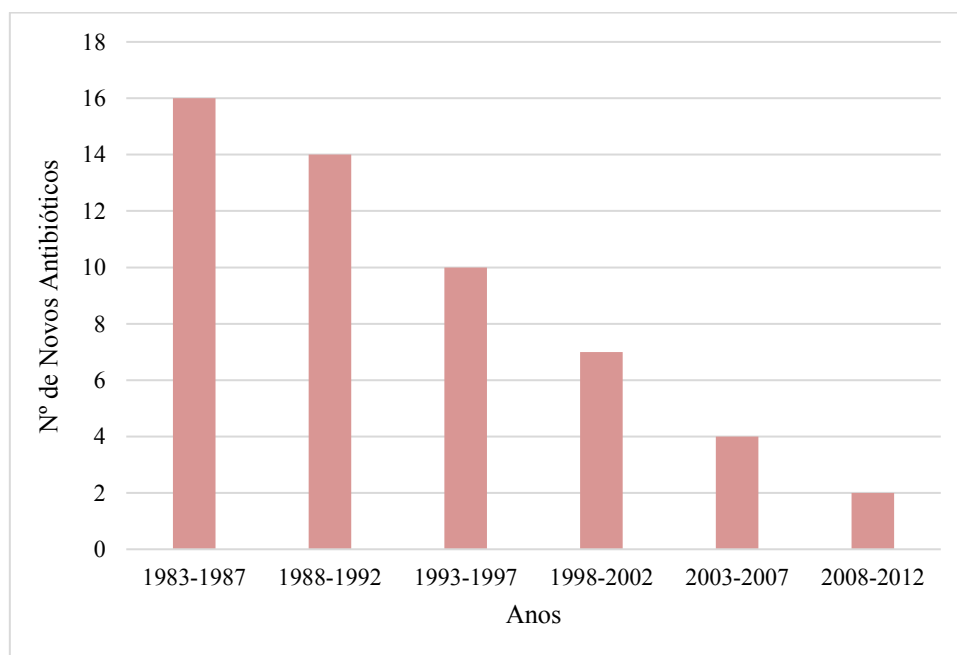


Figura 1 - Número total de novos antibióticos ao longo dos anos, até 2012 (adaptado de <http://www.who.int>)

Como mencionado acima, a exploração do combate à Tuberculose, mais especificamente ao *Mycobacterium tuberculosis*, com a utilização de péptidos antimicrobianos, devido às suas propriedades farmacodinâmicas e mecanismos de ação explicados adiante, é um exemplo da utilização de uma nova estratégia antimicrobiana para dar soluções aos clínicos no tratamento complicado desta doença (Padhi et al., 2014).

Os PAMs podem vir a ajudar na solução de muitos destes problemas. Com a fácil manipulação da sua sequência peptídica e síntese (também descritas abaixo), é possível contornar várias contrariedades e originar novas soluções para os problemas de hoje em dia. Por exemplo, o vírus *Influenza*, sendo um vírus com alta taxa de mutação e que afeta, a nível mundial, cerca de 20% da população, anualmente, estando na origem da morte de 250 000 a 500 000 pessoas por ano (Król, Rychłowska, & Szewczyk, 2014), pode ter mais hipóteses de tratamento com a existência de novas terapêuticas baseadas em péptidos antimicrobianos.

Estrutura dos Péptidos Antimicrobianos

As proteínas são constituídas por cadeias de aminoácidos que se dobram de modo a adquirirem uma estrutura tridimensional que determina a sua função. Em alguns péptidos antimicrobianos a estrutura tridimensional não é estável, devido à dimensão insuficiente e da falta de características físico-químicas que o permitam. Esta estrutura molecular de três dimensões é definida por quatro estados: a estrutura primária, a secundária, a terciária e a quaternária. A estrutura primária é caracterizada apenas pela sequência de aminoácidos que os compõem. Estes aminoácidos ligam-se entre si por ligações peptídicas entre o azoto (N) do grupo amida de um aminoácido e o carbono (C) do grupo carboxilo do aminoácido seguinte. A estrutura secundária resulta do enrolamento de certas porções da cadeia de aminoácidos sendo que cada péptido pode ter mais do que um tipo de estrutura secundária - consoante a localização dos dobramentos – que se divide em 4 tipos - a hélice α , a folha β , “random coil” e as voltas. A estrutura terciária refere-se à estrutura tridimensional adquirida pela proteína e é estabilizada tanto por ligações hidrofóbicas como por pontes de hidrogénio e ligações peptídicas podendo dividir-se por domínios - região do péptido dobrada de forma compacta. A estrutura quaternária refere-se ao número e à posição das subunidades (diversas cadeias peptídicas) nos péptidos.

Os PAMs até hoje conhecidos podem-se dividir em 4 tipos de estrutura consoante a sua estrutura secundária e possuindo a mesma organização:

- hélices α
- folhas β
- “random coil”
- voltas

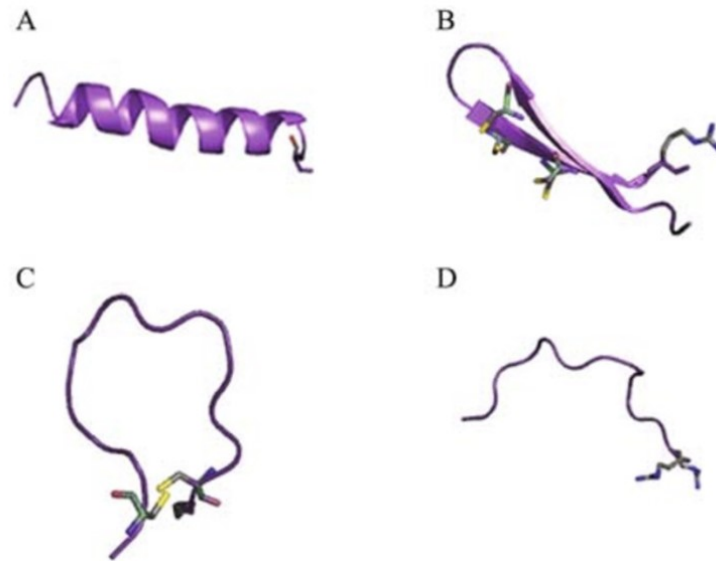


Figura 2 - Modelos moleculares das estruturas dos PAMs (Huang et al., 2010)

As estruturas mais comuns para estes péptidos são as hélices α , as folhas β e as voltas (todas se podem formar quando há criação de pontes de hidrogénio).

As hélices α caracterizam-se pela formação de pontes de hidrogénio entre o átomo de hidrogénio da porção N-terminal e o átomo de carbono da porção C-terminal do aminoácido quatro resíduos abaixo. As folhas β , por sua vez, são caracterizadas pela formação de pontes de hidrogénio entre os grupos CO e os grupos NH de duas cadeias adjacentes.

Ainda no caso das pontes de hidrogénio, quando as pontes são criadas entre os resíduos finais da cadeia de aminoácidos, a estrutura forma um U (volta).

Quando os monómeros estão conectados por ligações de igual comprimento mas em direções aleatórias, diz-se que adotam uma estrutura “random coil” (Smith, Fiebig, Schwalbe, & Dobson, 1996).

Os PAMs mais conhecidos que possuem uma estrutura em hélice α são a magainina, as catelicidinas, a indolicina, a cecropina e o pexiganano. Em folha β , apesar de não existirem tantos péptidos conhecidos com esta estrutura, a protegrina-1

é um exemplo demonstrativo (Bahar & Ren, 2013; Langham, Ahmad, & Kaznessis, 2008; Seo et al., 2012).

Ao contrário dos antibióticos que têm como alvos processos celulares específicos como, por exemplo, a replicação do ADN ou a síntese da parede celular, os PAMs têm como alvo a camada lipopolissacarídica da membrana celular sem necessitarem de recetores específicos. Daí ser de extrema importância a estrutura dos péptidos para a interação com essa membrana, evitando efeitos contra as células eucariotas (Huang et al., 2010; Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006).

Uma descrição mais aprofundada dos tipos de estrutura principal é realizada abaixo:

- Hélices α

Como definido em Bioquímica:

A hélice α é estabilizada por pontes de hidrogénio entre os grupos NH e CO da cadeia principal. Em particular, o grupo CO de cada aminoácido forma uma ponte de hidrogénio com o grupo NH do aminoácido que está situado quatro unidades adiante na sequência linear. Assim, exceto para os aminoácidos perto das pontas de uma hélice, todos os grupos CO e NH formam pontes de hidrogénio (Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2015)).

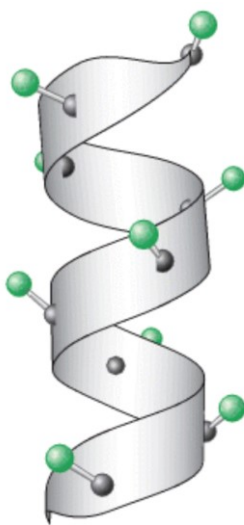


Figura 3 - Estrutura de uma hélice α (*Biochemistry* (2004)).

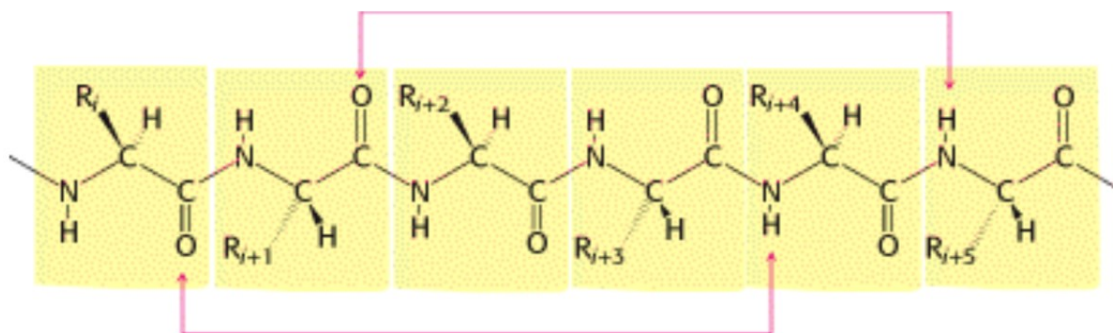


Figura 4 - Esquema de ponte de hidrogênio para uma hélice α (*Biochemistry* (2004)).

- Folha β

Este tipo de estrutura difere, em grande escala, da hélice α . Uma cadeia de péptidos (fita β) está totalmente distendida em vez de enrolada. Neste caso as cadeias laterais dos aminoácidos apontam para sentidos opostos. Segundo a mesma referência:

Uma folha β é formada pela união de duas ou mais fitas β por pontes de hidrogênio. As cadeias adjacentes numa folha β podem-se estender em sentidos opostos (folha β antiparalela) ou no mesmo sentido (folha β paralela). No arranjo antiparalelo, os grupos NH e CO de cada aminoácido fazem pontes de hidrogênio com os grupos CO e NH , respetivamente, da cadeia adjacente. No arranjo paralelo o esquema de pontes de hidrogênio é realizado com o grupo NH a fazer ponte de hidrogênio com o CO da fita adjacente, enquanto que o CO faz ponte com o NH do aminoácido a dois monómeros de distância (Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2015)).

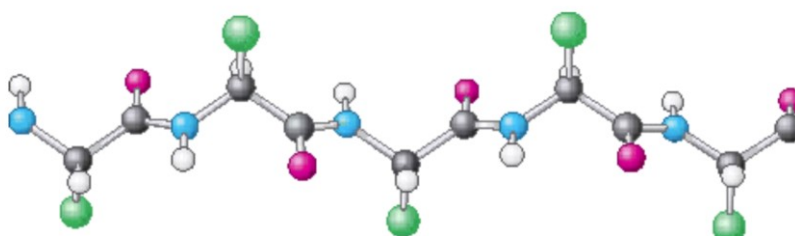


Figura 5 - Estrutura de uma fita β (*Biochemistry* (2004)).

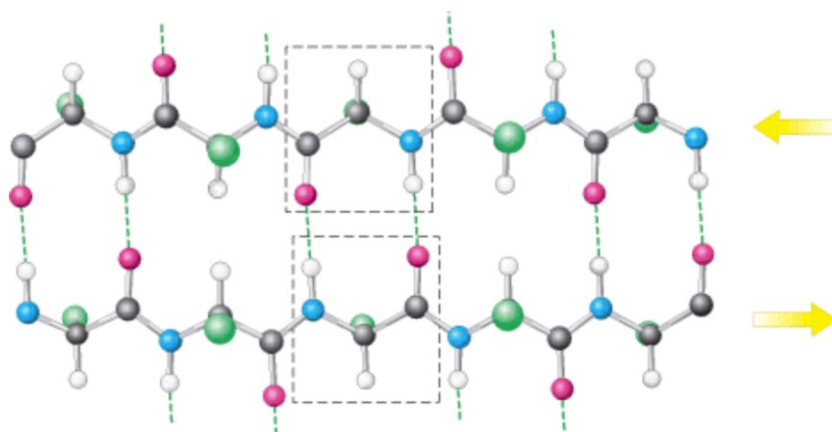


Figura 6 - Uma folha β antiparalela (*Biochemistry* (2004)).

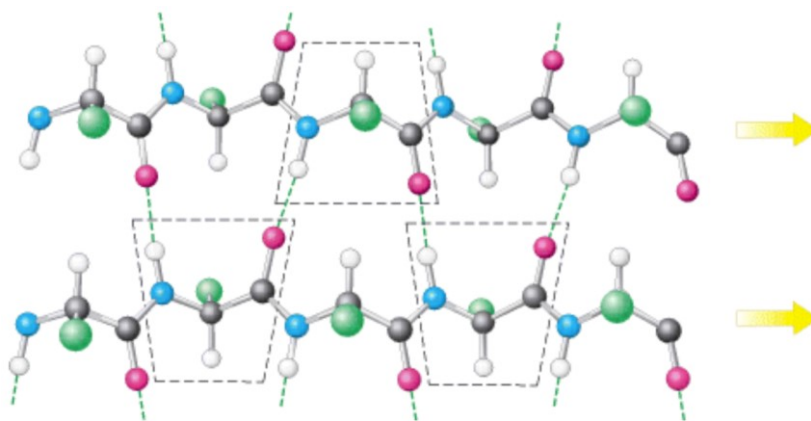


Figura 7 - Uma folha β paralela (*Biochemistry* (2004)).

- “Random coil”

Os péptidos deste tipo não possuem uma estrutura secundária clássica. Powers e Hancock sugerem que isso aconteça pelo elevado teor nos aminoácidos prolina e glicina presentes. Sugerem também que estes péptidos adquirem a sua estrutura final por ligações de hidrogénio e forças de Van der Waals com os lípidos de membrana e não por pontes de hidrogénio interresíduos, como acontece nas hélices α e folhas β . Um péptido exemplificativo deste tipo de estrutura é a indolicidina, um péptido com 13 aminoácidos isolado de neutrófilos bovinos, rico em triptofano (Powers & Hancock, 2003; Smith et al., 1996).

- Voltas

Este tipo de estrutura é caracterizado pela presença de uma única ligação (dissulfureto, amida ou isopeptídica) fazendo com que o péptido adquira uma conformação em U (volta). Segundo Powers e Hancock, o único péptido com uma estrutura bem definida em volta é a tanatina, um péptido com 21 aminoácidos que possui apenas uma ligação dissulfureto entre os aminoácidos 11 e 18. (Powers & Hancock, 2003)

Por serem formados por aminoácidos, os péptidos antimicrobianos podem ser facilmente estruturalmente alterados. Sendo assim pode ser possível criar péptidos totalmente sintéticos por síntese química (Wade, Lin, Hossain, & Dawson, 2012), ou por expressão recombinante (Piers, Brown, & Hancock, 1993; Ramos, Moreira, Rodrigues, Gama, & Domingues, 2013).

Os péptidos naturais ou sintéticos podem sofrer alterações estruturais que vão determinar a sua função/mecanismo de ação. Dentro dessas alterações estão a fosforilação, a adição de D-aminoácidos, a metilação, a amidação, a glicosilação, a formação de pontes dissulfureto e a clivagem proteolítica (Bahar & Ren, 2013).

Classificação dos Péptidos Antimicrobianos

Existem diversos métodos de classificação de péptidos antimicrobianos. Alguns autores classificam-nos pela sua estrutura (Mahlapuu et al., 2016); outros pela sua atividade biológica (Bahar & Ren, 2013); e mesmo quanto aos seus padrões de ligação (G. Wang, 2015).

Os péptidos antimicrobianos estão classificados quanto à sua atividade biológica, ou seja, se, por exemplo, são direcionados contra bactérias, vírus, fungos ou parasitas. Assim sendo podem ser divididos em cinco tipos:

1. Péptidos antibacterianos
2. Péptidos antivirais
3. Péptidos antifúngicos
4. Péptidos antiparasitários

De outra forma, e como mencionado acima, os péptidos podem ser classificados quanto à sua estrutura secundária, embora esta classificação seja morfológica quando analisamos a estrutura dos péptidos.

1. Péptidos antibacterianos

São os péptidos mais estudados no grande grupo de PAMs conhecidos atualmente e são, na sua maioria, catiónicos. Devido ao seu largo espectro de ação, a maioria dos péptidos antimicrobianos são ativos tanto contra bactérias Gram positivas (+) como Gram negativas (-) (Bahar & Ren, 2013; Shai, 2002; Zhang, Rozek, & Hancock, 2001).

Nesta classe de péptidos estão presentes todos os mecanismos de ação possíveis, como a interação com a membrana celular e consequente permeabilização/disrupção à interação com componentes intracelulares (bloqueio da síntese de ADN ou proteínas, por exemplo) (Brogden, 2005).

W. Brumfitt *et al.* demonstraram que a nisina, um péptido antimicrobiano produzido pelo *Lactococcus lactis*, possui um mecanismo de ação parecido com a vancomicina (interferência na síntese da parede celular, mais especificamente interferência na síntese do lípido II) e é ativa contra estirpes de bactérias resistentes à vancomicina (Brumfitt, 2002).

2. Péptidos antivirais

Foi estudado que os PAMs podem ser direcionados tanto contra vírus de ADN como de ARN. O seu espectro de atividade vai das doenças mais severas resultantes da atividade do VIH e do vírus da hepatite, a doenças mais ligeiras provocados pelo *Herpes simplex* vírus e *Influenza* vírus (Bahar & Ren, 2013; Skalickova et al., 2015).

Os péptidos antivirais podem matar células virais por rompimento das cápsulas virais, ligação a proteínas virais, bloqueio dos recetores virais ou, ainda, ocupação dos recetores nas células eucariotas aos quais os vírus se vão ligar. Podem ainda penetrar nas cápsulas virais e atuar dentro das células bloqueando ou alterando a expressão genética dos vírus. Um exemplo de péptido com atividade antiviral é a defensina, um péptido que se liga a glicoproteínas virais e impede o vírus do *Herpes simplex* (VSH) de se ligar às células do hospedeiro (Bahar & Ren, 2013).

Sinha *et al.*, descobriram que o péptido antimicrobiano NP-1 inativa o VSH e previne a entrada do vírus na célula pela inibição da translocação da VP-16 (uma proteína viral extremamente importante) para o núcleo da célula hospedeira, para além de evitar a distribuição de célula para célula. (Sinha, Cheshenko, Lehrer, & Herold, 2003)

Um efeito sinérgico entre péptidos antimicrobianos ou entre PAMs e outros fármacos é ideal para combater infeções virais e infeções bacterianas secundárias que, normalmente, se associam às primeiras. Devido ao seu amplo espectro de ação, isso pode ser conseguido até com o mesmo péptido (Bahar & Ren, 2013; Skalickova et al., 2015).

3. Péptidos antifúngicos

Os péptidos que se inserem nesta classificação são, normalmente, anfipáticos e possuem na sua estrutura aminoácidos polares e neutros. Podendo possuir qualquer uma das estruturas referidas acima estes péptidos podem matar microrganismos por diversos mecanismos: tanto por lise (por interação apenas com a superfície da membrana fúngica, aumentando a permeabilização, e pela agregação e formação de poros), por transposição da membrana e interação com alvos intracelulares, por interferência com a síntese da parede celular e com a biossíntese de componentes membranares essenciais (principalmente a quitina) (Bahar & Ren, 2013; Lucca & Walsh, 1999).

As catelicidinas são um exemplo de uma família de péptidos com grande atividade antifúngica. Estas têm potencial para se tornar novos agentes antifúngicos pela sua atividade contra alguns fungos multirresistentes contra os antifúngicos convencionais (Lucca & Walsh, 1999).

4. Péptidos antiparasíticos

Apesar de alguns organismos parasitas serem multicelulares, os PAMs que possuem atividade antiparasítica matam estes microrganismos pelos mesmos mecanismos que as classes anteriores, principalmente pela interação e permeabilização da membrana celular. Esta classe é menos numerosa que as anteriores, mas conta com alguns péptidos que também se encontram nas outras classes. É o caso da família das catelicidinas e a magainina que possuem atividade antiparasítica pela formação de poros. Park *et al.* demonstraram este mecanismo contra o parasita *Caenorhabditis elegans* (Y. Park, Jang, Lee, & Hahm, 2004).

Outro péptido com bastante atividade antiparasítica é a gomesina. A gomesina é um péptido derivado das aranhas que se descobriu ser altamente eficaz contra *Leishmania amazonensis* (X. Wang & Wang, 2016).

Devido à semelhança entre as células eucariotas dos parasitas e dos seres humanos a grande preocupação relacionada com esta classe de péptidos é a segurança. É

necessário ter em conta os efeitos hemolíticos e a especificidade destes péptidos no combate a estes agentes patogénicos (Alberola et al., 2004).

Para além desta classificação, os PAMs podem ser classificados quanto à sua carga, hidrofobicidade, helicidade ou estrutura (Skalickova et al., 2015).

Basicamente não existe uma única classificação para os PAMs. Podem ser classificados consoante o que se procura, intuitivamente.

Mecanismo de Ação dos Péptidos Antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos destroem as células por dois mecanismos distintos: permeabilização/rutura da membrana celular e interação com alvos intracelulares; basicamente isto divide-os em péptidos ativos na membrana e péptidos ativos intracelularmente (Huang et al., 2010). Outra designação para a base do mecanismo de ação dos PAMs divide-os em PAMs de rutura de membrana e PAMs de não-rutura de membrana, ou seja, que possuem alvos intracelulares (Powers & Hancock, 2003).

Para que qualquer uma destas vias seja possível, o passo chave que é necessário que aconteça é a primeira interação do PAM com a membrana do patógeno (Robert E W Hancock & Rozek, 2002; Powers & Hancock, 2003).

Normalmente o contacto inicial acontece devido a cargas electrostáticas derivadas das diferenças de cargas entre os péptidos e as membranas, *i. e.*, a carga catiónica da membrana do PAM liga-se à carga aniónica das membranas dos patógenos. Uma vez ligados, os PAMs tomam partido da sua estrutura anfipática (essencial para interação com os componentes hidrofóbicos da membrana) para causar rutura ou permeabilização da membrana, por inserção da sua extremidade hidrofóbica nessa membrana (Brandwein, Bentwich, & Steinberg, 2017; Huang et al., 2010)

Assim sendo, vários autores sugerem 3 tipos de modelos de interação dos péptidos antimicrobianos com a membrana celular dos agentes patogénicos. Yeaman & Yount (2003), Huang et al., (2010) e Giuliani et al., (2007) sugeriram os seguintes mecanismos como os principais mecanismos pelos quais os péptidos se ligam às membranas e, subsequentemente, comprometem a sua integridade:

1. Modelo “barrel-stave”
2. Modelo “carpet-like”
3. Modelo do poro toroidal

1. Modelo “barrel-stave”

Este modelo de interação com a membrana celular baseia-se na formação de poros por parte de grupos de hélices α ou folhas β anfipáticas de modo a que “as superfícies hidrofóbicas interajam com o núcleo lipídico da membrana e as suas superfícies hidrofílicas apontem para dentro, produzindo um poro aquoso” (Shai, 1999).

Os estudos sugerem que os péptidos aderem à superfície da membrana provavelmente como monómeros (este detalhe ainda não está totalmente provado). Após esta ligação, os péptidos sofrem uma transição conformacional que permite que as suas regiões hidrofóbicas possam ser inseridas na membrana, devido à interação com componentes hidrofóbicos complementares na mesma, começando a formar-se um poro (Huang et al., 2010; Yeaman & Yount, 2003).

Chegando a um limiar de concentração de péptido, ocorre auto-agregação (capacidade para dimerizar dos monómeros peptídicos e uma maior inserção no núcleo hidrofóbico da membrana, havendo um aumento do poro. Uma particularidade deste modelo é que no poro os péptidos estão intercalados com os grupos das cabeças fosfolipídicas da membrana (Huang et al., 2010; Yeaman & Yount, 2003).

Segundo Shai (1999), tratando-se de péptidos com uma estrutura em hélice α , os seguintes critérios necessitam de ser cumpridos para que haja formação do poro: a) é necessário que os monómeros se liguem à membrana numa estrutura em hélice α ; b) os monómeros necessitam de se reconhecer uns aos outros quando ligados à membrana; c) essas hélices inserem-se no núcleo hidrofóbico da membrana; d) para haver aumento do tamanho do poro é necessário existir recrutamento progressivo de monómeros adicionais.

A alameticina é um péptido antimicrobiano proveniente do fungo *Trichoderma viride*, possui uma estrutura em hélice α , atividade contra bactérias Gram +, fungos e parasitas e é um exemplo de péptido antimicrobiano com este tipo de mecanismo de permeabilização (Yeaman & Yount, 2003; “Antimicrobial Peptide Database” (2018)).

Outro exemplo de um péptido antimicrobiano formador de poros com estas características é a protegrina-1, proveniente dos leucócitos do javali *Sus scrofa*, com uma estrutura em folha β , é ativa contra bactérias Gram +, vírus (incluindo o retrovírus VIH) e fungos (Langham et al., 2008; “Antimicrobial Peptide Database” (2018)).

2. Modelo “carpet-like”

Neste tipo de modelo os péptidos alinham-se paralelos à superfície da membrana, ligam-se através de interações eletrostáticas e dispõem-se como uma “carpete”, quebrando a integridade da bicamada da membrana. Isto acontece quando existem concentrações elevadas do péptido no local (Bechinger, 2005; Shai, 1999).

Mais especificamente, a disposição dos péptidos na membrana faz com que haja uma alteração na fluidez da membrana e, quando é atingido um limiar de concentração, a membrana rompe devido a energética desfavorável. De uma maneira geral este modelo possui algumas características: os péptidos não se inserem na membrana, a membrana é dissolvida de uma maneira tipo dispersão e a rutura não segue a formação de um poro, como acontece no modelo anterior (Huang et al., 2010).

Da mesma forma que no modelo “barrel-stave”, Shai (1999) propõe quatro passos envolvidos no processo: a) ligação dos péptidos aos grupos de fosfolípidos; b) as moléculas alinham-se na superfície membranar de modo a que a sua superfície hidrofílica esteja a apontar para os grupos de fosfolípidos; c) rotação da molécula que leva à mudança de estrutura em direção ao núcleo hidrofóbico; e d) desintegração da membrana.

Segundo Yeaman & Yount (2003), a cecropina P1, um péptido antimicrobiano sintetizado pelo parasita nemátodo *Ascaris suum*, que possui uma estrutura em hélice α e atividade contra bactérias Gram + e Gram -, é um exemplo de um péptido que atua segundo este mecanismo. (“Antimicrobial Peptide Database” (2018))

Outro péptido que é também um exemplo de péptido com mecanismo de interação é a dermaseptina B2, um péptido antimicrobiano presente na pele do anfíbio *Phyllomedusa bicolor*, com uma estrutura em hélice α e atividade contra bactérias Gram

positivas e Gram negativas, fungos e ainda algumas células cancerígenas (Galanth et al., 2009; “Antimicrobial Peptide Database” (2018)).

3. Modelo do poro toroidal

Este é um dos modelos de interação dos péptidos com as membranas mais bem estudado. Assim como no modelo anterior, os péptidos iniciam a sua interação com a membrana paralelamente a esta, ligados por interações electroestáticas, embora quando apenas um péptido está conectado com a membrana não haja formação de poro. É necessário que haja agregação peptídica para que os péptidos se insiram na membrana. Assim, nesta conformação, os resíduos hidrofóbicos dos péptidos agregados deslocam as cabeças fosfolipídicas da membrana, abrindo uma falha na sua região hidrofóbica. A formação do poro ocorre quando o péptido mais inserido na membrana atinge as cabeças fosfolipídicas do interior da célula e se liga pelas mesmas forças eletrostáticas. Há formação de um poro aquoso e há passagem de péptidos juntamente com moléculas lipídicas para o interior, provocando um relaxamento do poro, passando este a tomar uma estrutura toroidal (Sengupta, Leontiadou, Mark, & Marrink, 2008; Yeaman & Yount, 2003).

Assim como nos modelos acima, no modelo do poro toroidal a concentração de péptidos afeta a interação com a membrana. Assim, quando o péptido se encontra em concentrações baixas as moléculas estão paralelas à superfície da membrana, não sofrem agregação e não há alteração da sua disposição, enquanto que quando a concentração de péptidos é maior e se atinge concentração crítica de agregação, estes tomam uma posição perpendicular à superfície e, pelos mecanismos acima, formam um poro (Sengupta et al., 2008). Este modelo é muito parecido com o modelo “barrel-stave” apenas com a diferença no contacto dos péptidos com a membrana, isto é, aqui os PAMs estão permanentemente em contacto com as cabeças fosfolipídicas da membrana (Bahar & Ren, 2013).

A magainina 2, um péptido antimicrobiano originário da pele do sapo-com-garras-africano (*Xenopus laevis*), com uma estrutura em hélice α e ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, antimalárica e antiparasitária, é um exemplo de um péptido formador de poros toroidais, juntamente com a melitina, outro péptido antimicrobiano

com uma estrutura em hélice α , proveniente do veneno das abelhas do mel (*Apis mellifera*), com ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária e anti-VIH (Lee & Lee, 2014; “Antimicrobial Peptide Database” (2018)).

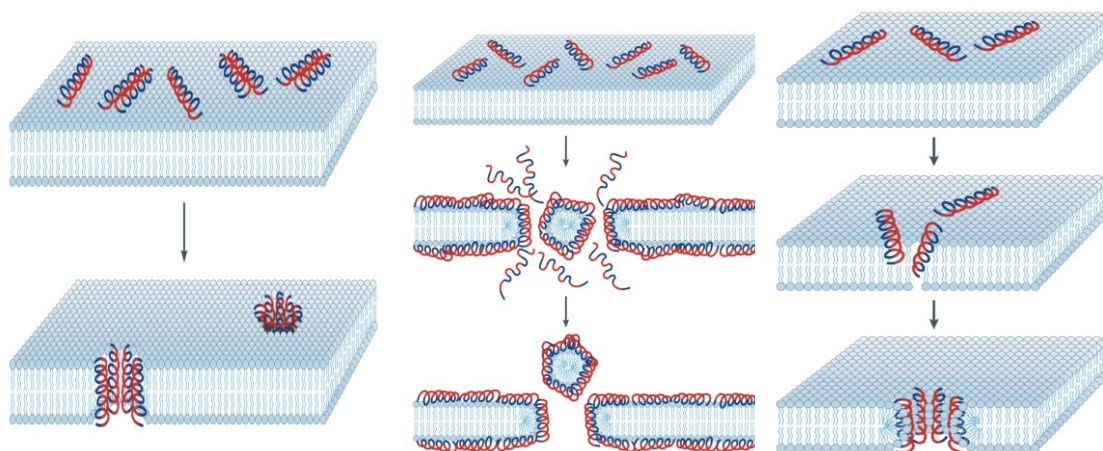


Figura 8 - O modelo “barrel-stave” (imagem da esquerda), o modelo “carpet-like” (imagem central) e o modelo do poro toroidal (imagem da direita) (Brogden, 2005).

Alguns autores sugerem outros dois tipos de modelos de interação pelos quais os péptidos podem permeabilizar a membrana. Esses dois modelos denominam-se modelo agregado e modelo de discriminação de membrana. O primeiro é bastante semelhante ao modelo anterior e foi proposto por Wu, Maier, Benz, & Hancock (1999). Neste modelo os péptidos reorientam-se aleatoriamente, inserem-se na membrana e associam-se a lípidos para formar complexos micelares. Estes complexos agregados formam poros transmembranares em que, ao contrário do modelo do poro toroidal, apenas se encontra um péptido no centro do poro e os péptidos não têm uma orientação bem definida. O modelo de discriminação de membrana possui um mecanismo diferente consoante a constituição da membrana ao qual se liga, isto é, possui um mecanismo diferente se se ligar a uma célula eucariota, como um glóbulo vermelho ao qual causa hemólise, pelo modelo “barrel-stave”, e outro mecanismo se se ligar a uma célula procariota, como a de um microrganismo, pelo modelo “carpet-like” (Chen et al., 2007; Huang et al., 2010).

Na maioria dos casos, por um destes modelos, os PAMs matam os microrganismos pela permeabilização/destruição da membrana. Nos casos em que a permeabilização não acaba em morte celular, alguns PAMs atuam por mecanismos de ação alternativos. É o caso dos PAMs ativos intracelularmente, referidos acima, ou

PAMs de não-rutura de membrana. Por exemplo, a indolicidina liga-se ao ADN, inibindo a sua síntese (Bahar & Ren, 2013; Giuliani et al., 2007).

Deste modo, existem alguns mecanismos pelos quais esses PAMs matam microrganismos: inibição da síntese proteica, de ADN e ARN, inibição da síntese da parede celular, inibição das proteases dos microrganismos, interferência em certas vias metabólicas no crescimento bacteriano e interação com organelos celulares (Bahar & Ren, 2013; Brogden, 2005; Yeaman & Yount, 2003).

O péptido antimicrobiano PR-39, proveniente do intestino dos porcos, é um exemplo de um péptido que após interação com a membrana, sem afetar a sua integridade, e entrada no meio intracelular, bloqueia tanto a síntese de ADN como a síntese proteica. Outro péptido que atua intracelularmente é a buforina II. Park *et al.* determinaram que a buforina II inibe as funções celulares de *E. coli*, após a penetração da membrana, pela ligação ao ADN e ARN. A apidaecina bloqueia a síntese de proteínas apenas em bactérias Gram negativas. Dois péptidos da família das batenecinas, Bac5 e Bac7, inibem a síntese de proteínas e ARN de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Bahar & Ren, 2013; Giuliani et al., 2007; C. B. Park, Kim, & Kim, 1998).

Para além destes péptidos existem vários exemplos de péptidos ativos intracelularmente. A histatina 5 inibe a protease de *Bacteriocides gingivalis* e impede que destrua o tecido periodôntico; este mesmo péptido pode penetrar em células fúngicas e inibir a função mitocondrial em *Candida albicans*. Para além deste péptido existem outros, como a pirrocoricina, a apidaecina e a drosocina, que atuam inibindo a atividade enzimática, nomeadamente a inibição das proteases, dos microrganismos (Brogden, 2005).

Yeaman & Yount (2003) referem ainda outro tipo de mecanismo de ação dos PAMs: a inibição da síntese da parede celular (com a inibição da síntese extracelular de biopolímeros), como, por exemplo, o peptidoglicano que está relacionado com a integridade e função da membrana e parede celular. A inibição direta ou indireta da síntese de peptidoglicano por parte dos péptidos antimicrobianos pode levar a rutura membranar, principalmente em bactérias Gram positivas, dado o facto de possuírem maior conteúdo em peptidoglicano nas suas membranas. A seminalplasmina e a

mersacidina são PAMs que seguem este mecanismo. Para além desta inibição pode haver também, por exemplo, a inibição da síntese de quitina em células fúngicas (Brogden, 2005).

Embora a maior parte dos PAMs seja ativa apenas contra um tipo de microrganismo, existem exceções, isto é, alguns péptidos podem atuar sobre mais do que um tipo de microrganismo, por diferentes mecanismos de ação. Para além da histatina 5, acima, a indolicidina, por exemplo, pode matar bactérias, fungos e o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (R. E. W. Hancock & Scott, 2000; Krajewski, Marchand, Long, Pommier, & Roller, 2004; D. G. Lee et al., 2003; Subbalakshmi & Sitaran, 1998). D. G. Lee *et al.* (2003), demonstraram que a indolicidina possui propriedades antifúngicas ao danificar a membrana celular, Subbalakshmi & Sitaran (1998) revelaram que a indolicidina eliminava *E. coli* ao penetrar nas células e inibir a síntese de ADN, e Krajewski *et al.* (2004), divulgaram que a indolicidina apresenta propriedades anti-VIH ao inibir a VIH-integrase.

Tabela 1: Modelos membranares e intracelulares de morte e lise celular pelos PAMs
(adaptada de (Brogden, 2005))

Modelo de atividade antimicrobiana	Exemplos de péptidos
<i>Mecanismos de formação de poros transmembranares</i>	
Poros toroidal	Magainina, protegrina-1, melitina, LL-37 e MSI-78
"Carpet-like"	Dermaseptina, cecropina, melitina, caerina e ovispirina
"Barrel-stave"	Alameticina
Modos de morte intracelular	
Alteração da formação da membrana citoplasmática	PR-39, indolicidina e microcina
Inibição a síntese da parede celular	Mersacidina
Ligação aos ácidos nucleicos	Buforina II e taquiplesina
Inibição da síntese dos ácidos nucleicos	Pleurocidina, dermaseptina, PR-39 e indolicidina
Inibição da síntese de proteínas	Pleurocidina, dermaseptina, PR-39 e indolicidina
Inibição da atividade enzimática	Histatinas, pirrocoricina, drosocina e apidaecina

Na Tabela 1 podemos relacionar os mecanismos de ação com alguns péptidos antimicrobianos estudados.

Relação entre estrutura, classificação e mecanismo de ação dos péptidos antimicrobianos

O mecanismo de ação dos PAMs está diretamente relacionado com a sua estrutura. Alguns autores, como Hadley e Hancock, descrevem a utilização de modelos *in silico* para estudar como a utilização de diferentes estruturas serve para criar um péptido com o mecanismo de ação indicado para combater um tipo específico de microrganismo e, conseqüentemente, desenvolver um fármaco para utilização clínica (Hadley & Hancock, 2010).

É a propensão para a formação de uma estrutura secundária de um péptido antimicrobiano, juntamente com as suas propriedades anfífilas e carga, que determina a sua ligação às membranas dos agentes patogénicos e, conseqüentemente, a sua função/mecanismo de ação (Jenssen et al., 2006).

Essa estrutura define qual o mecanismo pelo o qual o péptido permeabiliza/se insere na membrana e daí se o péptido mata o microrganismo por disrupção membranar ou por ação junto de alvos intracelulares. Como referido acima, existem algumas propriedades físico-químicas que potenciam ou inibem a atividade dos PAMs: tamanho, sequência, carga, conformação, hidrofobicidade e anfipaticidade. Essas propriedades estão dependentes da estrutura de cada péptido e, conseqüentemente, modulam a sua ação. Por exemplo, um péptido sintético de 15 aminoácidos correspondente à secção C-terminal da melitina possui 5 a 7 vezes menos atividade antimicrobiana mas, por outro lado, possui 300 vezes menos atividade hemolítica que a melitina natural. Noutro exemplo, Dong *et al.* (2002) desenvolveram análogos com hidrofobicidade diferente de um péptido derivado da bactéria *Helicobacter pylori* para demonstrar as diferenças entre um péptido com maior hidrofobicidade e outro com menor. Demonstrou-se que o péptido com uma hidrofobicidade aumentada possuía uma atividade antimicrobiana aumentada sem alterações na atividade hemolítica. Pelo contrário, o péptido com hidrofobicidade diminuída não demonstrou alterações na sua atividade (Huang et al., 2010).

Do que foi referido anteriormente, a propensão de um péptido antimicrobiano para formar uma determinada estrutura secundária é um fator determinante para o seu mecanismo de ação. De facto, os sistemas de classificação dos PAMs sugerem, por si só, a inter-relação entre o seu mecanismo de ação e a sua estrutura. Note-se que um péptido antimicrobiano pode possuir uma classificação de antibacteriano e, também, de antifúngico, por exemplo.

Resistência aos PAMs

“As bactérias encontram PAMs no seu ambiente natural e têm desenvolvido mecanismos para resistir à sua ação” (Andersson, Hughes, & Kubicek-Sutherland, 2016).

Estima-se que as resistências aos péptidos antimicrobianos sejam bastante difíceis de adquirir, devido às grandes mudanças estruturais a que os microrganismos teriam de ser sujeitos, somadas à diversidade enorme de PAMs. Embora isto aconteça existem alguns microrganismos (especialmente as bactérias) mais propícios a possuírem resistência inata aos PAMs, consoante as suas características estruturais ou funcionais (Giuliani et al., 2007).

A resistência aos PAMs pode ocorrer por dois tipos de mecanismos: constitutivos (ou passivos) e induzidos (ou adaptativos). Os mecanismos constitutivos consistem nas propriedades que os microrganismos possuem que conferem resistência e que são expressos independentemente da exposição a um péptido. Estirpes de bactérias de géneros como *Proteus*, *Morganella*, *Burkholderia*, *Serratia* e *Providencia* são exemplos de microrganismos que possuem estes mecanismos. Estas bactérias têm um dos constituintes da membrana (lípidos A nas Gram negativas e ácidos teicóicos nas Gram positivas) com uma carga mais positiva, o que reduz a interação dos PAMs com a sua membrana (Andersson et al., 2016; Yeaman & Yount, 2003).

Por outro lado, os mecanismos induzidos consistem em modificações moleculares (por exemplo, substituição, modificação e acilação das moléculas de membrana), tanto em bactérias Gram positivas como Gram negativas. As mais comuns partem da secreção e introdução de moléculas carregadas positivamente na sua membrana, de forma a reduzir a capacidade de ligação dos PAMs catiónicos. A degradação enzimática pela ação de proteases e peptidases que degradam os PAMs foi também descrita por alguns autores, com especial destaque para as proteases secretadas por *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. Para além destes dois mecanismos, o sistema de efluxo sensível aos PAMs que está presente em algumas estirpes bacterianas, tais como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae*, é também um

mecanismo de resistência eficaz no combate das bactérias aos PAMs. Este sistema não permite que os PAMs se insiram no interior da célula, retirando-os do interior da membrana, independentemente da estrutura que o péptido possua (Andersson et al., 2016; Bahar & Ren, 2013; Yeaman & Yount, 2003).

Alguns autores referem ainda um quarto e quinto mecanismos de resistência induzida: a modificação de alvos intracelulares e a secreção de proteínas carregadas negativamente para o meio extracelular. No caso de péptidos antimicrobianos que tenham como alvo constituintes do meio intracelular o primeiro mecanismo é extremamente útil para a sobrevivência de microrganismos. Pela existência de mecanismos complexos que alteram esses alvos é possível a obtenção de resistência, como por exemplo a mutação de um gene em *E. coli* que lhe confere resistência à microcina B17 (inibe a replicação do ADN). O segundo permite que os PAMs se liguem a estas proteínas carregadas negativamente de forma a não se ligarem às membranas dos microrganismos (Bahar & Ren, 2013; Yeaman & Yount, 2003).

Este conhecimento de algumas resistências que os microrganismos possuem contra os PAMs permite entender os mecanismos pelos quais os microrganismos da flora natural dos seres humanos se conseguem manter em equilíbrio e ajuda na síntese de novos péptidos que consigam contornar estas resistências em microrganismos patogénicos.

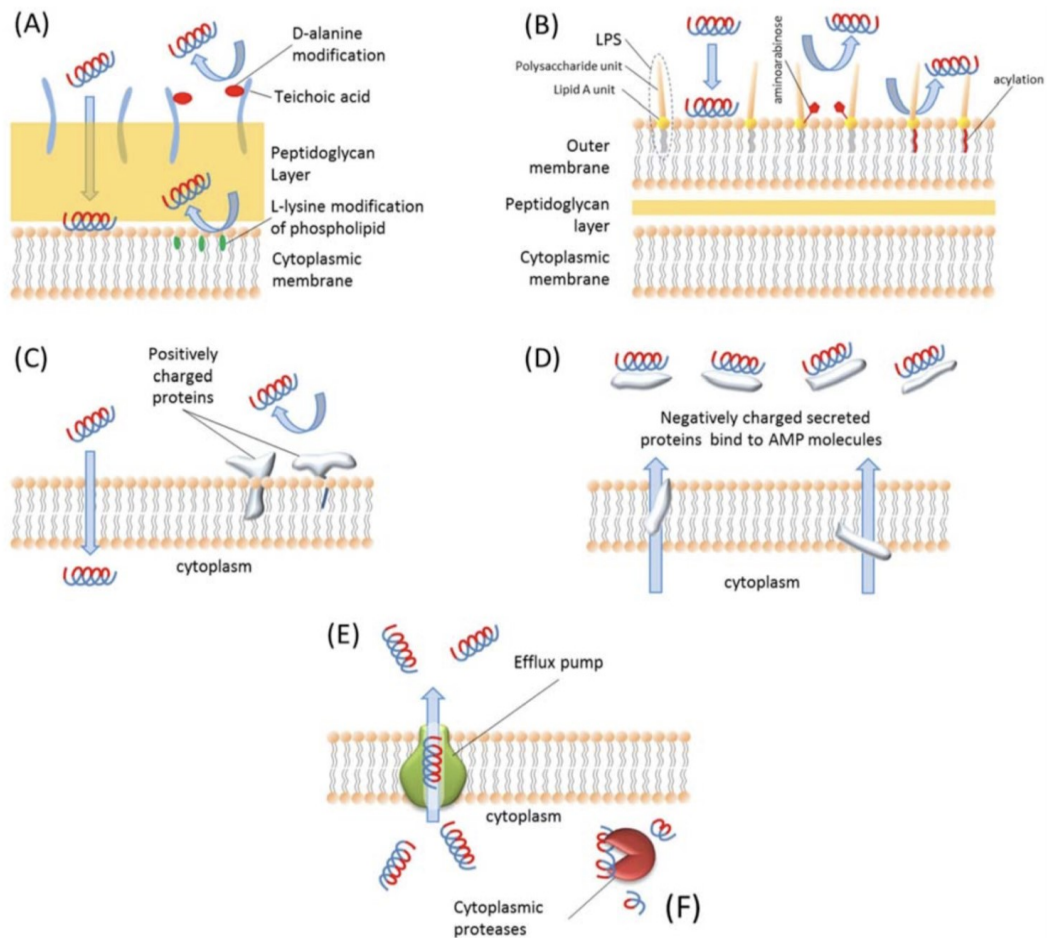


Figura 9 - Representação esquemática dos mecanismos de resistência aos PAMs. (A) Modificação dos ácidos teicóicos em bactérias Gram positivas. (B) Modificação do LPS em bactérias Gram negativas. (C) Secreção e introdução de moléculas carregadas positivamente na membrana. (D) Secreção para o meio extracelular de moléculas carregadas negativamente que se ligam aos PAMs. (E) Bombas de efluxo (Bahar & Ren, 2013).

Conclusão

“Atualmente, os péptidos são candidatos a agentes terapêuticos que oferecem seletividade e especificidade, baixos níveis de efeitos adversos e a possibilidade de aumentar a produção de níveis de mg para kg” (Skalickova et al., 2015).

Com o conhecimento que se possui atualmente da variedade de microrganismos patogênicos existentes, da existência de um elevadíssimo número de bactérias e bactérias resistentes aos fármacos atuais, vírus altamente mutagênicos e a luta para a cura de todas as doenças por eles causadas, os péptidos antimicrobianos vêm trazer uma alternativa viável para tentar solucionar muitos destes problemas.

Com uma elevada seletividade e potência, boa eficácia, segurança e tolerabilidade, para além de um mecanismo previsível, os PAMs apresentam-se como uma terapêutica atual e com grandes perspectivas futuras.

Embora possuam algumas fraquezas, como Fosgerau e Hoffman referiram na sua análise SWOT, como a instabilidade química e física, propensão à hidrólise e oxidação, semi-vida curta e rápida eliminação, os PAMs, por serem facilmente estudados e sintetizados, conseguem ultrapassar estes problemas (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Com esta monografia pode-se verificar que existem várias possibilidades de terapêuticas com PAMs, devido aos seus variados mecanismos de ação e, consequentemente, pouca probabilidade de resistências comparativamente aos fármacos existentes.

Hoje em dia existem vários péptidos antimicrobianos em ensaios clínicos e muitos mais em vias de entrarem nessa fase. Na tabela seguinte são apresentados alguns PAMs que já estão nesta fase, assim como a indicação clínica de cada um e a sua via de administração.

Tabela 2 - PAMs em fase clínica de desenvolvimento (adaptada de (Mahlapuu et al., 2016)).

PAM	Descrição	Fase	Indicação	Administração
Pexiganano (MSI-78)	Análogo da magainina	Fase III	Úlceras diabéticas infectadas	Creme tópico
Omiganano	Derivado da indolicidina	Fase II/III	Infeção do catéter e rosácea	Gel tópico
Lytixar (LTX-109)	Peptidomimético antimicrobiano sintético	Fase I/II	Infecções não complicadas por Gram positivos, impetigo e colonização nasal por <i>S. aureus</i>	Hidrogel tópico
hLF1-11	Derivado da lactoferricina	Fase I/II	Bacterémia e infecções fúngicas em recebedores imunocomprometidos de transplantes de células estaminais hematopoiéticas	Tratamento intravenoso (em solução salina)
Novexatina (NP-213)	Derivado das defensinas	Fase II	Onicomicose	Tratamento tópico
CZEN-002	Octâmero dimérico derivado do α -MSH	Fase IIb	Candidíase vaginal	Gel vaginal
LL-37	Catelicidina	Fase I/II	Úlceras venosas nas pernas difíceis de tratar	Solução polivinílica baseada em álcool para administração na ferida
PXL01	Derivado da lactoferricina	Fase II	Prevenção da formação de adesão pós-cirúrgica em cirurgias à mão	Hidrogel baseado em ácido hialurônico para administração no local da cirurgia
Iseganano (IB-367)	Derivado da protegrina 1	Fase III	Mucosite oral em doentes a receber radioterapia para tumores malignos da cabeça e pescoço	Solução oral
PAC-113	Derivado da histatina 3	Fase II	Candidíase oral em doentes seropositivos para o VIH	Colutório

Em resumo, este é um campo com grandes perspectivas de desenvolvimento, cada vez mais estudado. Com a entrada de vários péptidos para a fase clínica do seu estudo e com cada vez maior conhecimento dos seus mecanismos de ação e padrões de resistência, os PAMs têm tudo para ser reconhecidos como potenciais terapêuticas com elevados benefícios.

Bibliografia

- Alberola, J., Rodríguez, A., Francino, O., Roura, X., Rivas, L., & Andreu, D. (2004). Safety and Efficacy of Antimicrobial Peptides against Naturally Acquired Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 2–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.641>
- Andersson, D. I., Hughes, D., & Kubicek-Sutherland, J. Z. (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, 26, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>
- Avrahami, D., & Shai, Y. (2002). Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly, and cell selectivity. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi011549t>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Bechinger, B. (2005). Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: A 31P solid-state NMR spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1712(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.03.003>
- Benkerroum, N. (2008). Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 4856–4867. <https://doi.org/10.5897/AJB08.072>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2004). *Biochemistry* (5^a ed). Guanabara Koogan (Ed.)
- Brandwein, M., Bentwich, Z., & Steinberg, D. (2017). Endogenous antimicrobial peptide expression in response to bacterial epidermal colonization. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01637>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brumfitt, W. (2002). Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating

- antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), 731–734. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf190>
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1398–1406. <https://doi.org/10.1128/AAC.00925-06>
- Davies, J. (2006). Where have all the antibiotics gone? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 287–290. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>
- de Maio Carrillho, C. M. D., Gaudereto, J. J., Martins, R. C. R., de Castro Lima, V. A. C., de Oliveira, L. M., Urbano, M. R., ... Costa, S. F. (2017). Colistin-resistant Enterobacteriaceae infections: clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.007>
- Dong, G. L., Hee, N. K., Park, Y., Hyung, K. K., Bo, H. C., Choi, C. H., & Hahm, K. S. (2002). Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(02\)00373-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(02)00373-4)
- Dubos, R. J., & Hotchkiss, R. D. (1941). The Production of Bactericidal Substances By Aerobic Sporulating Bacilli. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.73.5.629>
- Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., ... Galdiero, S. (2016). Marine antimicrobial peptides: Nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ijms17050785>
- Fernández-Vidal, M., Jayasinghe, S., Ladokhin, A. S., & White, S. H. (2007). Folding amphipatic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *Journal of Molecular Biology*, 370(3), 459–470.

- <https://doi.org/10.1021/nl061786n>.Core-Shell
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
- Galanth, C., Abbassi, F., Lequin, O., Ayala-Sanmartin, J., Ladram, A., Nicolas, P., & Amiche, M. (2009). Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi802025a>
- Giangaspero, A., Sandri, L., & Tossi, A. (2001). Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry*, 268, 5589–5600. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(200007\)54:1<27::AID-BIP30>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(200007)54:1<27::AID-BIP30>3.0.CO;2-3)
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. F. (2007). *Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics*. *Central European Journal of Biology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>
- Groves, M. L., Peterson, R. F., & Kiddy, C. A. (1965). Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/2071007a0>
- Hadley, E. B., & Hancock, R. E. W. (2010). Strategies for the discovery and advancement of novel cationic antimicrobial peptides. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.
- Hancock, R. E. W., & Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- Hancock, R. E. W., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8856–8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8856>
- HIRSCH, J. G. (1958). Bactericidal action of histone. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.108.6.925>
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides:

- Relationships of structure and function. *Protein and Cell*, 1(2), 143–152.
<https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of Net Charge and the Number of Positively Charged Residues on the Biological Activity of Amphipathic α -Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Biopolymers*, 90(3), 369–383. <https://doi.org/10.1002/bip.20911.Effects>
- Krajewski, K., Marchand, C., Long, Y. Q., Pommier, Y., & Roller, P. P. (2004). Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activity of dimeric and tetrameric analogs of indolicidin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.08.061>
- Król, E., Rychłowska, M., & Szewczyk, B. (2014). Antivirals - current trends in fighting influenza. *Acta Biochimica Polonica*.
- Langham, A. A., Ahmad, A. S., & Kaznessis, Y. N. (2008). On the nature of antimicrobial activity: A model for protegrin-1 pores. *Journal of the American Chemical Society*, 130(13), 4338–4346. <https://doi.org/10.1021/ja0780380>
- Lee, D. G., Kim, H. K., Kim, S. A., Park, Y., Park, S. C., Jang, S. H., & Hahm, K. S. (2003). Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00755-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00755-1)
- Lee, J., & Lee, D. G. (2014). Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: Membrane disruption and apoptosis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 759–764. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11058>
- Lucca, A. J. De, & Walsh, T. J. (1999). Antifungal Peptides : Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens MINIREVIEW Antifungal Peptides : Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens, 43(1), 1–11.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides:

- An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Martin, L., van Meegern, A., Doemming, S., & Schuerholz, T. (2015). Antimicrobial peptides in human sepsis. *Frontiers in Immunology*, 6(JUL), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00404>
- Melo, M. N., & Castanho, M. A. R. B. (2012). The mechanism of action of antimicrobial peptides: Lipid vesicles vs. bacteria. *Frontiers in Immunology*, 3(AUG), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00236>
- Nakatsuji, T., & Gallo, R. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 887–895. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.387>.Antimicrobial
- Padhi, A., Sengupta, M., Sengupta, S., Roehm, K. H., & Sonawane, A. (2014). Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects. *Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.011>
- Park, C. B., Kim, H. S., & Kim, S. C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(1), 253–257. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>
- Park, Y., Jang, S. H., Lee, D. G., & Hahm, K. S. (2004). Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against caenorhabditis elegans. *Journal of Peptide Science*. <https://doi.org/10.1002/psc.518>
- Parslow, T. G., Toros, E. F., & Voeux, P. L. (2004). *Imunologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Phoenix, D., Dennison, S. R., & Harris, F. (2013). *Antimicrobial peptides*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA.
- Piers, K. L., Brown, M. H., & Hancock, R. E. W. (1993). Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90168-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90168-3)

- Powers, J. P. S., & Hancock, R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>
- Ramos, R., Moreira, S., Rodrigues, A., Gama, M., & Domingues, L. (2013). Recombinant expression and purification of the antimicrobial peptide magainin-2. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1002/btpr.1650>
- Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E., & Marrink, S. J. (2008). Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(10), 2308–2317. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.06.007>
- Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B.-J. (2012). Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules*, 17(12), 12276–12286. <https://doi.org/10.3390/molecules171012276>
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), 55–70. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X)
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*. <https://doi.org/10.1002/bip.10260>
- Sinha, S., Cheshenko, N., Lehrer, R. I., & Herold, B. C. (2003). NP-1, a rabbit alpha-defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 494–500. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.494>
- Skalickova, S., Heger, Z., Krejcova, L., Pekarik, V., Bastl, K., Janda, J., ... Kizek, R. (2015). Perspective of Use of Antiviral Peptides.pdf. *Viruses*.
- Smith, L. J., Fiebig, K. M., Schwalbe, H., & Dobson, C. M. (1996). The concept of a random coil: Residual structure in peptides and denatured proteins. *Folding and Design*, 1(5), 95–106. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(96\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00046-6)
- Strasfeld, L., & Chou, S. W. C. (2011). Antiviral Drug Resistance: Mechanisms and

- Clinical Implications. *Infectious Disease Clinical North American*, 24(2), 413–437.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.01.001>.Antiviral
- Subbalakshmi, C., & Sitaran, N. (1998). Mechanism of Antimicrobial Action of Indolicin. *Microbiology Letters.*, 160(December 1997), 91–96.
- Wade, J. D., Lin, F., Hossain, M. A., & Dawson, R. M. (2012). Chemical synthesis and biological evaluation of an antimicrobial peptide gonococcal growth inhibitor. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1305-z>
- Wang, G. (2015). Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Methods Mol Biol.*, (1268), 43–66.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2285-7>
- Wang, X., & Wang, G. (2016). Insights into Antimicrobial Peptides from Spiders and Scorpions. *Protein and Peptide Letters*, 23(8), 707–721.
<https://doi.org/10.1002/aur.1474>.Replication
- Westerhoff, H. V, Juretić, D., Hendler, R. W., & Zasloff, M. (1989). Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17), 6597–6601.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6597>
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., & Hancock, R. E. W. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1021/bi9826299>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.
<https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>
- Zaffiri, L., Gardner, J., & Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of antibiotics. from salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*.
<https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099>
- Zhang, L., Rozek, A., & Hancock, R. E. W. (2001). Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes. *Journal of Biological Chemistry*,

276(38), 35714–35722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104925200>